

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK



GENETIČKA NESTABILNOST TUMORA I TELOMERE

GENETIC INSTABILITY IN CANCER AND TELOMERES

ZAVRŠNI SEMINARSKI RAD

Željka Trepotec

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: doc. dr. sc. Inga Marijanović

Zagreb, rujan 2012.

POPIS KRATICA

ALT	Alternative length telomeres; alternativno produljenje telomera
AT	Ataxia telangiectasia
ATM	Ataxia telangiectasia mutated; serin / treonin kinaza
ATR	Ataxia telangiectasia + Rad3 protein
BER	Base excision repair; popravak krivo sparenih baza izrezivanjem
CD28	Cluster of differentiation; determinacijski signal na limfocitima
CDK	Cyclin – dependent kinase / ciklin – ovisna kinaza
CHK	Csk homologna kinaza
DNA-PK	DNA protein – kinaza
EF2	Elongacijski faktor 2
ERCC1	DNA excision repair protein
H2AX	Kodirajući gen za histon H2A
HNPCC	Hereditary nonpolyposis colorectal cancer; nepolipozni rak debelog crijeva
HR	Homologna rekombinacija
MIN	Microsatellite instability; mikrosatelitna nestabilnost
MRE11	Mre11 + Rad50 + Nbs1 proteini
NBS1	Nijmegen breakage syndrome 1
NER	Nucleotide excision repair; popravak nukleotida izrezivanjem
NF2	Neurofibromin 2; Merlin protein

NHEJ	Non – homologous end joining; povezivanje nehomolognih krajeva
OIS	Onkogen inducirana senescencija
pRB	Retinoblastoma protein
RAD	Radiation; proteini uključeni u NER
RPA	Replikacijski protein A
TC	Transcription coupling
TERC	Telomerase reverse calup; kalup za sintezu telomera
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase; katalitička podjedinica RT
TFIIH	Transkripcijski faktor
VEFG	Vascular endotel growth factor/ vaskularni endotelni faktor rasta
XP	Xeroderma pigmentosum; bolest koja je posljedica disfunkcije NER-a
XPA	Xeroderma pigmentosum, komplementacijska grupa A
XPB	Xeroderma pigmentosum, komplementacijska grupa D
XPG	Xeroderma pigmentosum, komplementacijska grupa G

Sadržaj

1. UVOD	1
2. OPĆA SVOJSTVA TUMORA	2
1.1. Izbjegavanje stanične smrti.....	3
1.2. Migracija tumorskih stanica.....	4
1.3. Angiogeneza	4
1.4. Izbjegavanje supresora rasta	6
1.5. Konstantno održavanje proliferacijskog signala	7
1.6. Replikativna besmrtnost	8
2. TELOMERE.....	9
2.1. Struktura i funkcija telomera	10
2.2. Enzim telomeraza	11
3. DESTABILIZACIJA GENOMA	13
3.1. Reaktivacija telomerase i alternativno produljenje telomera kao karcinogenetski proces	13
3.2. Mehanizmi destabilizacije genoma	16
3.2.1. Popravak dvolančanog loma DNA.....	16
3.2.2. Homologna rekombinacija.....	17
3.2.3. NHEJ	18
3.3. Mehanizmi obrane od destabilizacije genoma	18
3.3.1. Kontrola staničnog ciklusa	19
8. ZAKLJUČAK.....	21
9. LITERATURA	22
10. SAŽETAK.....	23
11. SUMMARY	24

1. UVOD

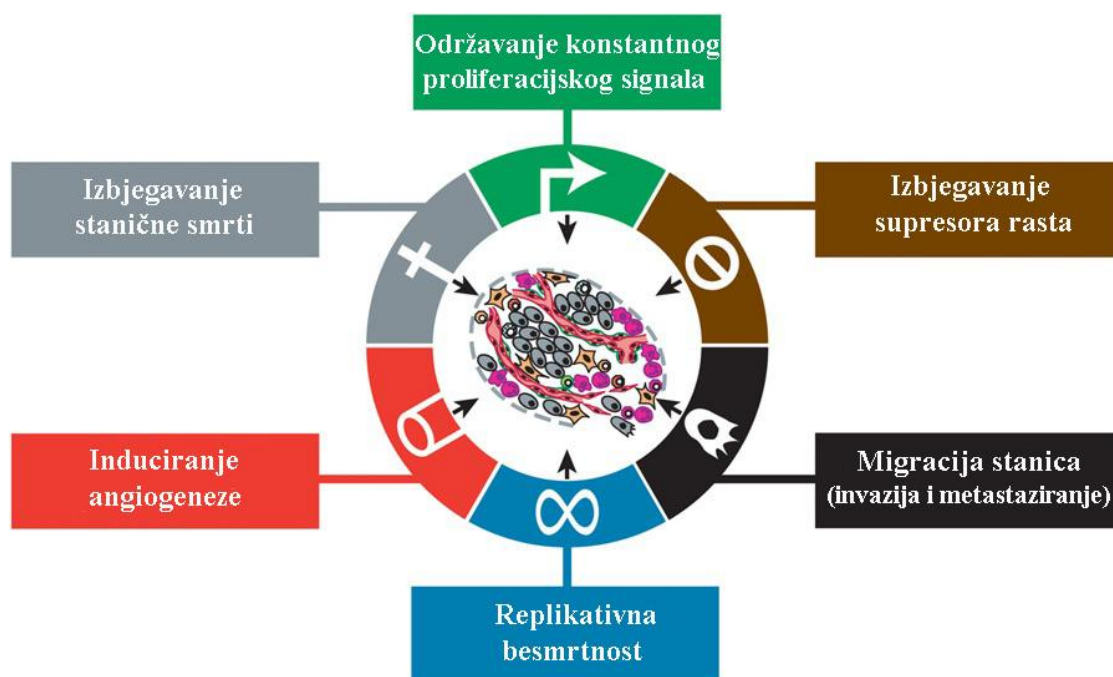
Prilagodbe za preživljavanje organizmi su stekli poznatim prirodnim zakonima. Od jednostaničnih organizama do složenih tkiva integriranih za očuvanje homeostaze, zakoni prirodnog odabira izvršeni su slučajno, ali iznimno pedantno, čemu svjedoče skladni mehanizmi funkcioniranja organizma kao cjeline. Prirodna selekcija generacijama organizama omogućuje prikupljanje poželjnih osobina, a uz to, mikroevolucijski im dopušta promjene i svakoj stanici u organizmu. Na svojoj osnovnoj razini, tumor je proizvod primijenjene prirodne selekcije. Značajan preduvjet nastanka tumorskih stanica jest destabilizacija genoma stanica, čime gube kontrolu nad staničnim ciklusom i ponašaju se autonomno.

Fenotipu tumora doprinose razni poremećaji staničnih mehanizama, poput proliferacije, apoptoze, diferencijacije, migracije, metabolizam tijekom prenatalnog i postnatalnog razdoblja. Biosignalni, kontrolni i metabolički putovi vješto su isprepleteni, pa je njihovu molekularnu specifičnost i povezanost teško proučavati.

Kao i svaki entitet, tako i kromosom nastoji zadržati svoju samosvojnost i integritet. To postiže telomerama, nukleoproteinskim završecima karakterističnih repetitivnih sljedova nukleotida. Svakom diobom oni se skraćuju zbog nejednolike replikacije dvolančane uzvojnice. Progresivnim skraćivanjem stanice mogu izbjeći kontrolne točke diobenog ciklusa, pri čemu nastaju potencijale mutacije tj. destabilizacija genoma koja vodi nastanku tumora.

2. OPĆA SVOJSTVA TUMORA

Tumor je, dakle, rezultat mikroevolucije, evolucije na razini stanice, proizvod prirodne selekcije. Tumorske stanice svojim karakteristikama značajno se razlikuju od ostalih, normalnih stanica koje nastoje održati homeostazu, a tako i integritet cjelokupnog organizma. Svojstva koja su te stanice stekle omogućuju im autonomno ponašanje, neovisno o okolnim tkivima. Prema "Hallmarks of Cancer: The Next Generation" ^[1], organizirana je podjela na šest zasebnih cjelina, bioloških svojstava tumorskih stanica koja su zapravo posljedica deregulacije višestaničnosti (**Slika 1**). Aktivacijski i supresorski putovi tih svojstava međusobno se isprepliću, stoga je vrlo teško promatrati samo jedno svojstvo, bez konteksta ostalih svojstava.



Slika 1; Svojstva tumorskih stanica po kojima se razlikuju od zdravih (Održavanje konstantnog proliferacijskog signala, izbjegavanje supresora rasta, migracija stanica, replikativna besmrtnost, induciranje angiogeneze, izbjegavanje stanične smrti)

Izvor: D. Hanahan & R.A. Weinberg - Hallmarks of Cancer: The Next Generation

1.1. Izbjegavanje stanične smrti

Jedna od osobina višestaničnosti jest održavanje homeostaze i integriteta cijele jedinke, što je kontrolirano mehanizmima na razini međustanične komunikacije. Uobičajeno je da stanice koje su pretrpjele preveliko, nepopravljivo oštećenje DNA umru apoptotički – programiranom staničnom smrću koju izvršava obitelj proteina nazvanih kaspaze. U protivnom, postoji opasnost da naruše homeostazu cjelokupnog organizma i počnu se ponašati autonomno tj. neovisno o djelovanju okolnih stanica.

Apoptotički okidač uključuje signale regulatora i efektor, a kontroliran je ravnotežom tj. omjerom pro i anti-apoptotičkih faktora.

Mnogostruki signali uključeni u proces apoptoze povećavaju mogućnost tumorskih stanica da brojnošću mehanizama izbjegnu apoptozu i tako evoluiraju prema malignom stanju. Dosad najpoznatija strategija jest gubitak supresorske funkcije proteina TP53, koji je ključan u eliminaciji poznavanja oštećenja koje bi inače dovelo do apoptoze.

Osim apoptoze, u uklanjanju nenormalnih stanica uključen je i proces autofagija. Događa se kada stanice, u uvjetima nedostatka hranjivih tvari, lizosomima probave vlastite organele. Pretpostavlja se da bi taj proces mogao imati važnu ulogu u otklanjanju tumorskih stanica, jer se delecijom obje kopije gena koji kodira tumor supresor Beclin-1 (ujedno i promotor autofagije) višestruko povećava broj tumora ^[2].

Uz navedene, postoje i drugi mehanizmi obrane organizma od vlastitih promijenjenih stanica i tumora. Tu ubrajamo i proces starenja ili senescencije. Temelji se na zaustavljanju staničnog ciklusa, kako se prikupljena oštećenja ne bi prenosila na stanice kćeri. Onkogen – inducirana senescencija (OIS) sprječava proliferaciju stanica zbog rizika od transformacije.

1.2. Migracija tumorskih stanica

Progresivnost i metastaziranje tumora moguća je tek nakon što se uspostavi povoljna mikrookolina, stroma, koja sadrži faktore rasta, regulatorske enzime, krvne žile i ostale komponente koje prvenstveno služe za regulaciju stanične funkcije, a time i održavanja homeostaze. Proliferacijom tumorskih stanica stvara se potreba da zauzmu i okupiraju teritorij unutar organizma. Tumori su razvili dvije metode zauzimanja svoje niše, a to su invazija (direktna migracija i penetracija u okolno tkivo) i metastaziranje (penetracija stanica u krvno – limfni sustav odakle dalje prodiru u bilo koja tkiva).

Oba procesa događaju se unutar mikrookoline tumora gdje tumorske stanice izmjenjuju signale koji modificiraju izvanstanični matriks i promoviraju proliferaciju. Primijećena je povećana prisutnost nekoliko proteinskih obitelji, npr. integrina koji omogućuju interakciju između stanica i izvanstaničnog matriksa; katherini za staničnu interakciju s okolinom; metaloproteaze koje su odgovorne za procese remodeliranja tkiva (npr. epitelnog u mezenhimalno) razgrađujući komponente izvanstaničnog matriksa.

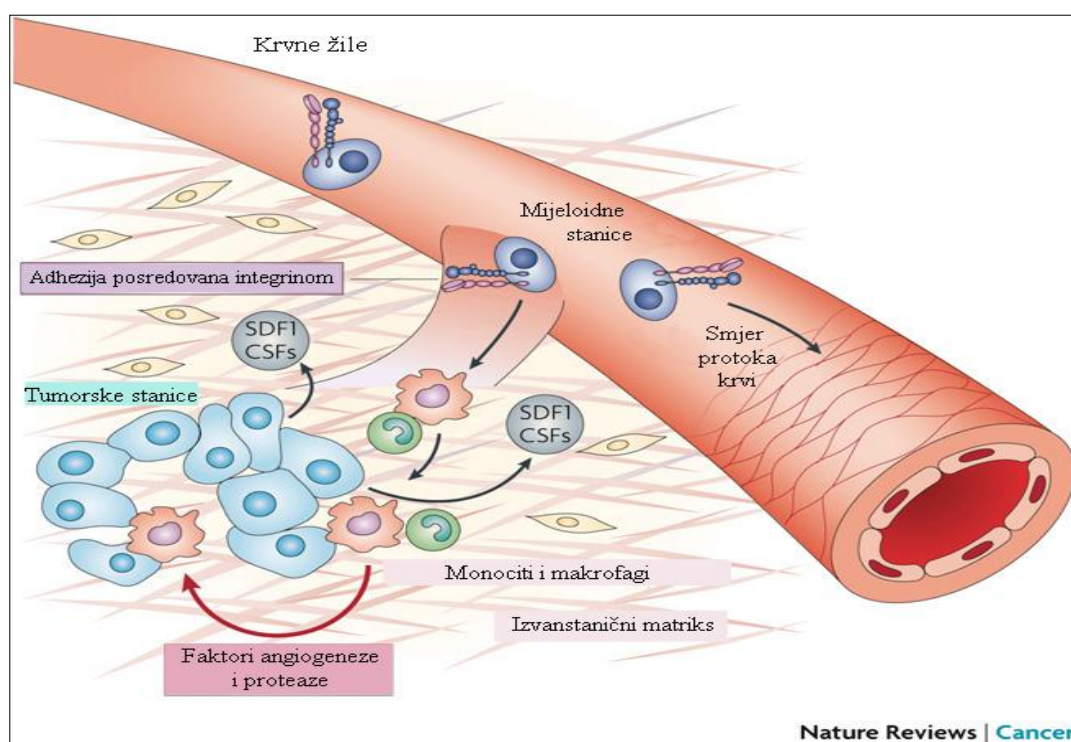
Migracija tumorskih stanica krajnji je pokazatelj njihove uspješnosti, prvenstveno stoga što moraju savladati obrambene mehanizme i uspostaviti vlastitu autoregulaciju.

1.3. Angiogeneza

Kao i kod svake zdrave stanice, tako i kod tumorskih, mora postojati sustav opskrbljivanja hranjivim tvarima i kisikom, kao i odvođenjem otpadnih produkata.

Tijekom embriogeneze, razvoj krvožilnog sustava podrazumijeva stvaranje novih endotelnih stanica i njihovo povezivanje u žile u svrhu prokrvljivanja novog tkiva iz već postojeće krvne žile. U odrasloj jedinki takvi procesi aktiviraju se samo tijekom posebnih fizioloških stanja, poput zacjeljivanja rana i mjesečnog krvarenja u žena.

Progresija tumora zahtijeva neprekidnu aktivnost ovog procesa tj. direktno je ovisna o stupnju angiogeneze - prokrvljenosti tumorskih stanica (**Slika 2**). Indukcija angiogeneze ovisna je o omjeru anti-angiogenih i pro-angiogenih faktora koje izlučuju i tumorske stanice i stanice strome. Tumorske stanice mijenjaju taj omjer u svoju korist overekspresijom pro-angiogenih faktora i negativnom regulacijom anti-angiogenih faktora. Najpoznatija obitelj pro-angiogenih faktora je VEGF (eng. Vascular endotel growth factor; prvi otkriveni pro-angiogeni faktori, označili su velik obrat u istraživanju tumora), a ujedno su i značajni protoonkogeni. Značajan je utjecaj nekoliko faktora zajedno, poput interleukina-8, angiogenina, angiopoietina; iako i svaki zasebno potiče nastajanje krvnih žila.



Slika 2; Prikaz nastajanja novih krvnih žila oko tumorskih stanica (angiogenetske promjene započinju pod utjecajem proangiogenih faktora rasta koji stimuliraju endotelne stanice krvnih žila da proliferiraju, migriraju i stvaraju membrane novih krvnih žila)

Izvor: <http://www.nature.com/nrc/journal/v8/n8/images/nrc2353-f2.jpg>

1.4. Izbjegavanje supresora rasta

Uz sposobnost održavanja konstantne proliferacijske signalizacije, tumorske stanice moraju zaobići mehanizam koji negativno reguliraju staničnu proliferaciju, koji uvelike ovisi o aktivnosti tumor-supresorskih gena. Dva najvažnija tumor-supresor gena kodiraju proteine RB (retinoblastoma) i TP53. Oni su centralne točke regulacije staničnog ciklusa; mjesto odlučivanja sudbine stanice - proliferacija ili obustava rasta senescencijom / apoptoza.

Tumorske stanice u deficitarnom putu stanične kontrole preko RB supresora nemaju ključnu kontrolnu točku stanične progresije, čime je omogućena kontinuirana proliferacija. RB protein provodi inhibitorni signal rasta koji dopire u stanicu iz okoline, dok TP53 reagira na signale unutar stanice koji nastaju u stresnim ili abnormalnim uvjetima.

Već od samih početaka uspostave primarnih staničnih linija u kulturi primijećeno je da stanice podliježu dvodimenzijalnom rastu u jednom sloju koji je ograničen konfluentnoću, odnosno kontaktnom inhibicijom, potaknuto supresijom proliferacije zbog intenzivnog kontakta između stanica. Kontaktna inhibicija obustavljena je kod tumorskih stanica u kulturi, što upućuje na to da taj proces *in vivo* osigurava homeostazu. Jedan od mehanizama ovog procesa uključuje produkt gena *NF2* (nazvan Merlin) koji je dugo smatran tumor – supresorom. Omogućuje i sinkronizira kontaktnu inhibiciju preko adhezijskih molekula na površini stanica (E-kadherini) do transmembranskih, tirozin - kinaznih receptora. Merlin tako pojačava međusobnu adheziju stanica preko kadherina, a ujedno i limitira prijenos signala za mitozu ^[3].

1.5. Konstantno održavanje proliferacijskog signala

Tijekom razvoja, brojni složeni mehanizmi uključeni su u proliferaciju, povećanje broja stanica, koje se tada diferenciraju za obavljanje visokospecijaliziranih funkcija unutar organa kojem su namijenjene. Nakon završetka razvoja, ti događaji odvijaju se i dalje u većini tkiva, bilo kao trajni dinamički procesi (poput nastajanja hematopoetskih stanica) ili kao odgovor na abnormalne uvjete.

Tumorske stanice posjeduju specifična svojstva po kojima se znatno razlikuju od zdravih stanica. Kronična proliferacija omogućuje im, za početak, kvantitativnu prednost nad zdravim stanicama. Deregulacijom staničnih signala uključenih u održavanje homeostaze i regulacije staničnog ciklusa, same postaju krojači svoje sudbine. Održavanje sustava vlastite regulacije proliferacije postižu na nekoliko alternativnih načina: produkcijom faktora rasta ili stimulacijom normalnih stanica preko strome koja podržava tumorske stanice, čime opskrbljuju tumorske stanice faktorima rasta. Poremećaj signalizacije preko receptora također može biti dereguliran povećanjem broja receptora na površini stanica, čineći te stanice preosjetljivima čak i na niske koncentracije faktora rasta tj. liganda.

Početne studije ponašanja onkogeni i ekspresije proteina značajnih u signalizaciji pokazale su da je količina proteina i faktora rasta koje stanice izlučuju proporcionalna s proliferacijom tumorskih stanica.

1.6. Replikativna besmrtnost

Beskonačni replikativni potencijal tumorskih stanica daje im ogromnu prednost nad ostalim, zdravim stanicama koje prolaze kroz ograničen broj staničnih ciklusa, nakon čega odlaze u senescenciju (ireverzibilno fiziološko stanje stanice u kojem ne može proliferirati, ali je vijabilna) ili u krizno stanje koje uključuje staničnu smrt. Tumorske stanice razvile su taktike za vješto izbjegavanje ove tragične sudbine, što je zapravo besmrtnost.

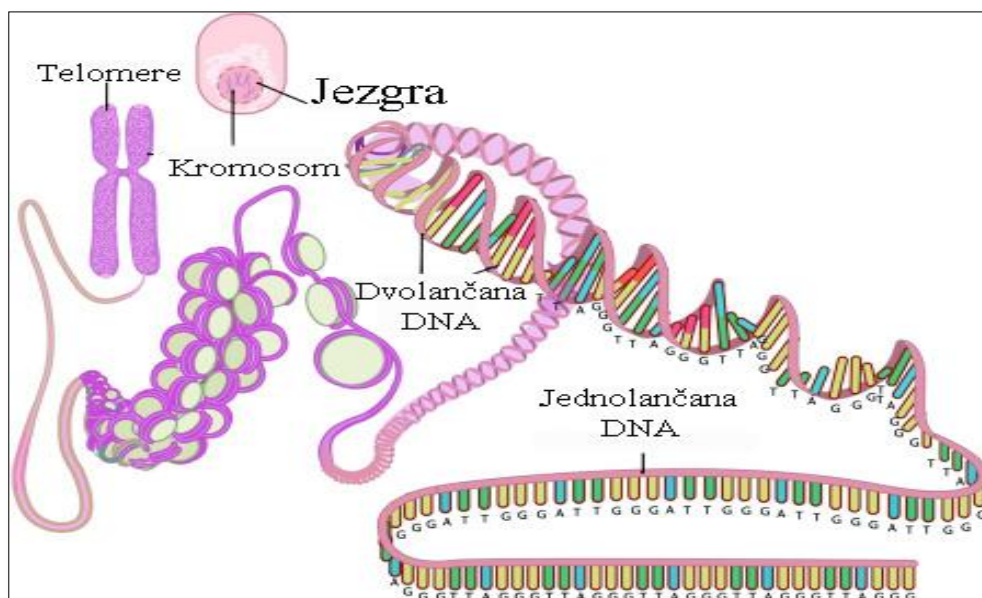
Mnogi dokazi upućuju na to da telomerni krajevi koji štite kromosom imaju ključnu ulogu u održavanju besmrtnosti tumorskih stanica. Produljivanjem telomernih krajeva stanice bivaju besmrtni tj. otporne na svoju ciljanu sudbinu – senescenciju ili smrt ^[4].

Početnim istraživanjima na telomerama i njihovom utjecaju na starenje, duljinu i kvalitetu života otvorile su se mnoga dodatna pitanja o mogućim dodatnim ulogama telomere. Time je došlo do novih, značajnih otkrića koja ukazuju da je sustav zamršeniji nego se u početku mislilo, jer telomere, osim u starenju, imaju značajnu ulogu i u karcinogenezi.

U samim počecima istraživanja osobina tumorskih stanica i uzrocima njihova nastanka, smatralo se da su razlozi nestabilnosti genoma pretežito mutacijske promjene gena koji kodiraju proteine važne za popravak i održavanje genomskog integriteta. Kasnije je otkriveno da velik izvor genomske nestabilnosti leži u telomerama.

2. TELOMERE

Telomere su nukleoproteinski kompleksi koji se sastoje se od repetitivne dvolančane DNA nukleotidnog slijeda TTAGGG (u ljudskim stanicama) povezane proteinima, a nalazimo na krajevima linearnih kromosoma svih eukariotskih organizama (**Slika 7**). Primarna uloga im je očuvanje stabilnosti i integriteta kromosoma, sprječavanje međusobne homologne (HR) i nehomologne (NHEJ) rekombinacije krajeva, kao i zaštita od degradacije nukleazama. Kada kromosomi ne bi imali telomernu zaštitu na svojim krajevima, tijekom svake stanične diobe izgubili bi važan dio genetske informacije. Razlog zbog kojeg prokariotski kromosom ne sadrži telomere logičan je; pošto je kružnog oblika, ne sadrži krajeve.



Slika 7; Repetitivni slijed nukleotida – telomera na krajevima kromosoma

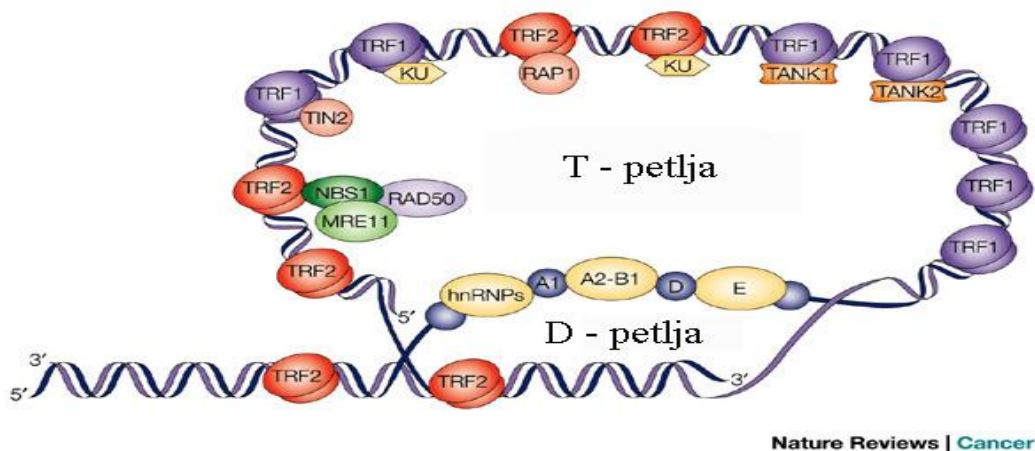
Izvor: <http://www.anti-agingfirewalls.com/2011/03/27/the-epigenetic-regulation-of-telomeres/>

Duljina telomera varira od vrste do vrste, a u čovjeka iznosi 5 – 15 kB. Sastoji se pretežno od guanozin - bogatih regija u slijedu od 6 do 8 ponavljanja. Proučavanjem na modelnim organizmima – sisavcima, utvrđeno je da visoko-organizirana sekundarna i tercijarna struktura DNA i proteina ima ulogu u zaštiti krajeva kromosoma. Kada bi stajali samostalno, mehanizmi dvolančanog popravka prepoznali bi ih kao potencijalne kandidate za popravak i nastala bi fuzijska formacija ^[5].

2.1. Struktura i funkcija telomera

Telomerne petlje simbolično su nazvane T – petljama, a nastaju kada se jednolančana DNA obavije oko telomer – vezajućih proteina. S druge strane, jednolančani stršeci 3' GT bogati telomerni kraj ulazi u dvolančanu zavojnici kromosoma, narušava je i stvara stabilnu trolančanu strukturu s komplementarnim dijelom, nazvanu D – petljom (displacement loop). U ljudskim stanicama najvažniji proteini vezani na dvolančanu telomernu strukturu su TRF1 koji regulira duljinu telomera i TRF2 koji štiti krajeve od nehomolognog sparivanja u svrhu popravljivanja dvolančanog loma i ostalih oštećenja. Pot1 sudjeluje zajedno s TRF1 u regulaciji duljine telomera, a veže 3' jednolančani telomerni kraj.

Metodama precipitacije kromatinom nađeni su i ostali proteini koji sudjeluju u pravilnom smatanju telomera i njihovoj funkciji nakapnice kromosoma. Prvenstveno su to proteini uključeni u NHEJ popravak oštećenja DNA, poput Ku70, Ku86, i DNA-PKcs proteini. Također, nađeni su i Rap1, Mre11 kompleks koji sadrži Mre11, Rad50 i Nbs1 protein ^[5], (Slika 8).



Slika 8; Struktura ljudskih telomera

Izvor: http://www.nature.com/nrc/journal/v2/n11/fig_tab/nrc929_F1.html

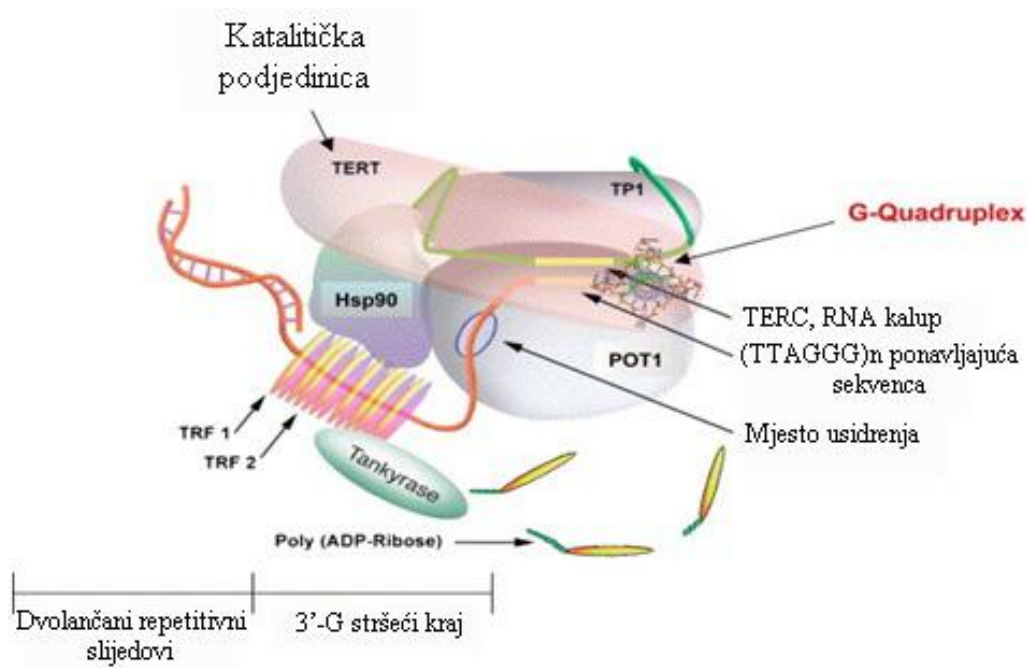
Duljina telomera služi kao mehanizam kojim se sprječava nekontrolirani rast stanica, a time se definira i proliferacijski potencijal. U somatskim stanicama koje su izgubile kontrolu nad proliferacijom ili gubitkom p53 supresorske aktivnosti, skraćivanje telomera glavni je izvor genetske nestabilnosti koji vodi do promjena kojima stanice postaju besmrtni i poprimaju fenotip tumora.

2.2. Enzim telomeraza

Tijekom normalnog staničnog ciklusa, DNA - polimeraza za replikaciju koristi RNA početnicu, čime telomerni krajevi nisu replicirani te je aktivnost telomerase neophodna. DNA – polimeraza tijekom replikacije može sintetizirati DNA samo u 5' → 3' smjeru dodavanjem nukleotida na postojeću RNA početnicu koje se kasnije zamjenjuju s DNA.

Zamjena RNA moguća je na mjestima početka replikacije usred kromosoma jer polimeraza može koristiti prethodni 5' lanac, dok na telomernom kraju to nije moguće zbog nedostatka pozicije na koju bi nova početnica sjela. Taj problem posljedica je replikacije koja ne počinje na krajevima kromosoma, već na određenim mjestima unutar kromosoma čime nastaju dva replikativna lanca: vodeći i tromi. Na vodećem lancu DNA polimeraza normalno sintetizira u smjeru 5' → 3', no problem se javlja kod tromog lanca. Kratke sekvence RNA koje se koriste kao početnice nanizane su na tromom lancu u određenoj udaljenosti od inicijacijskog mjesta, a DNA – polimeraza počinje replikaciju na mjestu inicijacije, što uzrokuje pojavu Okazakijevih fragmenata. Nakon što je dodana posljednja RNA početnica, sjedaju enzimi: RNA nukleaza koja cijepa RNA početnice, DNA – polimeraza koja umeće nukleotide koji popunjavaju šupljine i ligaza koja ih spoji u jedan lanac. Kako bi se mogla provesti zamjena RNA s DNA, ispred RNA početnice mora postojati DNA početnica. U tromom lancu ona ne postoji, posljednju RNA početnicu degradiraju enzimi te dolazi do gubitka telomernog dijela na 5' kraju.

Enzim telomeraza jest specijalizirani ribonukleoproteinski kompleks koji prepisuje na principu reverzne transkripcije i tako nadograđuje izgubljeni telomerni dio kromosoma tijekom normalne sinteze DNA u S fazi, koji bi inače bio deletiran. Sadrži telomerni RNA kalup (hTERC) koji služi za dodavanje specifičnih ponavljajućih sljedova i katalitičku podjedinicu reverzne transkriptaze (hTERT), (**Slika 9**). TERC telomerne sekvence u ljudskim stanicama čine repetitivni niz TTAGGG nukleotida.



Slika 9; Kompleksni enzim telomeraza sa svojim podjedinicama hTERT i hTERC

Izvor: [http://www.cancerletters.info/article/S0304-3835\(06\)00166-2/abstract](http://www.cancerletters.info/article/S0304-3835(06)00166-2/abstract)

Tijekom embrionalnog razvoja, razina telomeraze visoka je u svim stanicama, no nakon rođenja, njena aktivnost zadržava se (većinom) samo u matičnim i spolnim stanicama. U normalnim, zdravim somatskim ljudskim stanicama, telomeraze nema dovoljno da nadoknadi duljinu telomera, tj. razina hTERC jedva je mjerljiva, što uzrokuje progresivan, nenadoknativ gubitak telomera sa svakom diobom stanica. Stršeci 3' jednolančani krajevi koji ostaju nakon diobe uzrokuju smanjen proliferacijski kapacitet, a taj se proces fenotipski manifestira kao starenje.

Iako većina somatskih stanica ne posjeduje enzim telomerazu, iznimka su T - stanice imunološkog sustava. Regulacija razine telomeraze u njima u ovisnosti je s aktivacijom specifičnim antigenima ^[6]. Zamijećeno je da je razina telomeraze tijekom aktivacije T – limfocita visoka kao i kod tumorskih stanica, no svakom diobom razina enzima se smanjuje. Također, gubitak telomernog aktivnosti korelira s gubitkom ekspresije CD28 specifičnih determinacijskih antigena koji se nalaze na površini svakog zrelog citotoksičnog T – limfocita^[7].

3. DESTABILIZACIJA GENOMA

Već od samih početaka proučavanja karakteristika tumorskih stanica primijećeno je da bi nestabilnost genoma mogla imati ključnu ulogu u njegovu nastanku, kao i u progresiji. Ipak, mehanizmi još uvijek nisu do kraja poznati jer taj zamršen proces obuhvaća i zdrave stanice koje toleriraju promijenjene susjedne. Prije svega, za nastanak tumora potrebno je uspostaviti balans između genomske nestabilnosti i vijabilnosti, jer samim povećanjem broja mutacija raste i letalnost stanica.

Telomerni krajevi kromosoma ključni su za održavanje genomskog integriteta i stabilnosti. U normalnim ljudskim stanicama telomerni krajevi se svakom diobom skraćuju, sve dok ne postanu prekratki za daljnje diobe, te tada stanica apoptotički umire ili ulazi u senescenciju.

3.1. Reaktivacija telomeraze i alternativno produljenje telomera kao karcinogenetski proces

Ljudske stanice, kako *in vivo* tako i one *in vitro*, rastu do neke granice kada nastupa prekid diobe koji je uzrokovan prekratkim telomerama. Na molekularnoj razini, prekid proliferacije uzrokovan je aktivnošću p53 supresorskog proteina ili pRB, retinoblastom supresora koji je ključan za fazu stagnacije Go ukoliko okolni uvjeti nisu zadovoljavajući (u ovom slučaju, prekratke telomere). Ta replikativna barijera nazvana je u čast svog otkrivača; Hayflickov limit. Gubitkom funkcije p53 i pRB proteina ljudske stanice podliježu Hayflickovom limitu, što je ključno u aktivaciji senescencije uzrokovanoj skraćenim telomerama. Pod takvim uvjetima progresivnog skraćivanja telomera uz diobe stanica, posljedica je povećana nestabilnost genoma. To vodi u progresiva gubitak stanične vijabilnosti i proliferacijskog kapaciteta tj. krizno stanje. U takvoj situaciji stanica prepoznaje golemu količinu oštećene DNA ili gubitka DNA materijala, što bi moglo dovesti do masovne smrti velikog broja stanica. Stanice između smrti i vijabilnosti biraju vijabilnost, koja može biti potaknuta naglim povratkom telomerne funkcije pozitivnom transkripcijskom regulacijom

(aktivacija TERT gena) ili mehanizmom alternativnog produljenja telomera (ALT) koji uključuje aktivaciju homologne rekombinacije.

Povratak telomerne funkcije ne vraća stanicu u zdravo stanje, već samo utišava signale oštećenja i sprječava velika oštećenja nasljednog materijala, čime zapravo dovodi stanice u predtumorski stadij jer je razina genomske nestabilnosti vrlo visoka.

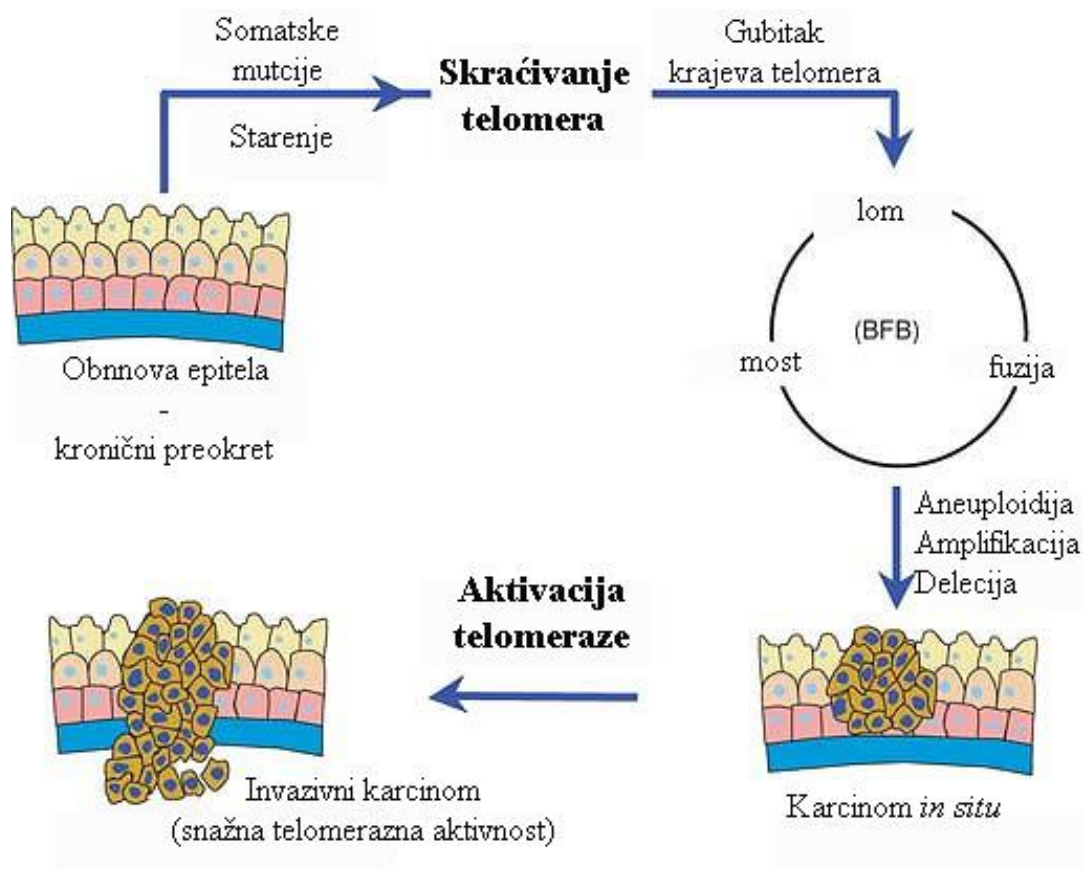
Transkripcijski regulirana aktivnost TERT gena ključan je proces u reaktivaciji telomerazne aktivnosti. Transkripcijska aktivacija TERT gena, uz njih prepisuje i neke onkoproteine, dok je ALT povezan sa smanjenom supresijom p53 proteina. Međutim, pokazalo se da je ALT mehanizam prisutan kod stanica s deficijentnim popravkom krivo sparenih baza, pa je potrebna homologija kromosoma. Svega 5 – 10% ljudskih tumorskih epitelnih stanica podliježe aktivaciji ALT mehanizma, koji je zbog toga još uvijek vrlo nepoznat. Ideja je da je ALT mehanizam manje učinkovit u očuvanju telomera, pa se pretpostavlja da je telomerazna aktivnost potrebna za maligne transformacije, kao i za metastatski potencijal ^[8].

Telomerazna aktivnost prisutna je u više od 80% svih tumorskih stanica, što ide u prilog tvrdnji da ima važnu ulogu u malignosti.

Primijećeno je da su telomere kod tumorskih stanica znatno skraćene nego kod stanica normalnih, zdravih tkiva. To bi moglo značiti da se skraćivanje telomera događalo u vrlo ranoj evolucijskoj povijesti tumora, kada transformacija stanica još nije dostigla vrhunac, a telomerazna aktivnost bila je niska ^[5].

Reaktivacijom telomerazne aktivnosti telomere se produljuju, ali se povećava vjerojatnost prespajanja kromosoma, a time i karcinogenetskih procesa. Prespajanje kromosoma vrši se preko mehanizama loma, fuzije i ponovnog spajanja, čime se u stanicama kćeri gomilaju genetske prekarcinogenetske promjene poput delecije, aneuploidije i translokacije. U takvim ranim stadijima karcinoma deaktiviraju se putovi neophodni za provjeru telomera, čime se povećava proliferacijska sposobnost i genetska nestabilnost. Uočeno je da se kod ljudi tijekom starenja zbog prevelikog nakupljanja oštećenja DNA ili onkogenih lezija također mogu deaktivirati putovi za provjeru telomera, čime stanice ulaze u kritičnu fazu.

Epitelne stanice neprekidno se stvaraju i zamjenjuju stare stanice. Ukoliko u njima dođe do somatskih mutacija inaktiviranjem kontrolnih točaka, a uz to i skraćivanja telomera, inicira se BFB ciklus (breakage-fusion-bridge; **Slika 10**). Lomovi u kromosomu uzrokuju fuziju s drugim kromosomom, prilikom čega nastaju dicentrični kromosomi. Takav proces stanicama omogućuje da izbjegnu kritično stanje i ostanu vijabilne, ali u malignom obliku.



Slika 10; Disfunkcijske telomere uzrokuju genetičku nestabilnost epitelnih stanica, čime se inducira proces karcinogeneze.

Izvor: Devita, Hellman & Rosenberg's Cancer - Principles & Practice of Oncology, 8th Edition.

3.2. Mehanizmi destabilizacije genoma

Izvadredna sposobnost genomskog sustava da detektira i popravi oštećenja osigurava vrlo nisku stopu spontanih mutacija tijekom svakog staničnog ciklusa. Zbog potrebe da sinkoniziraju mutagenezu, tumorske stanice često povećavaju stopu mutacija. Njihovom akumulacijom oslabljuje se genomski integritet i sposobnost popravka, te se takve oštećene stanice prisilno vode u proliferaciju. Mutacijama proteina ključnim u procesima popravka čiji opisi slijede, postiže se željeni cilj.

3.2.1. Popravak dvolančanog loma DNA

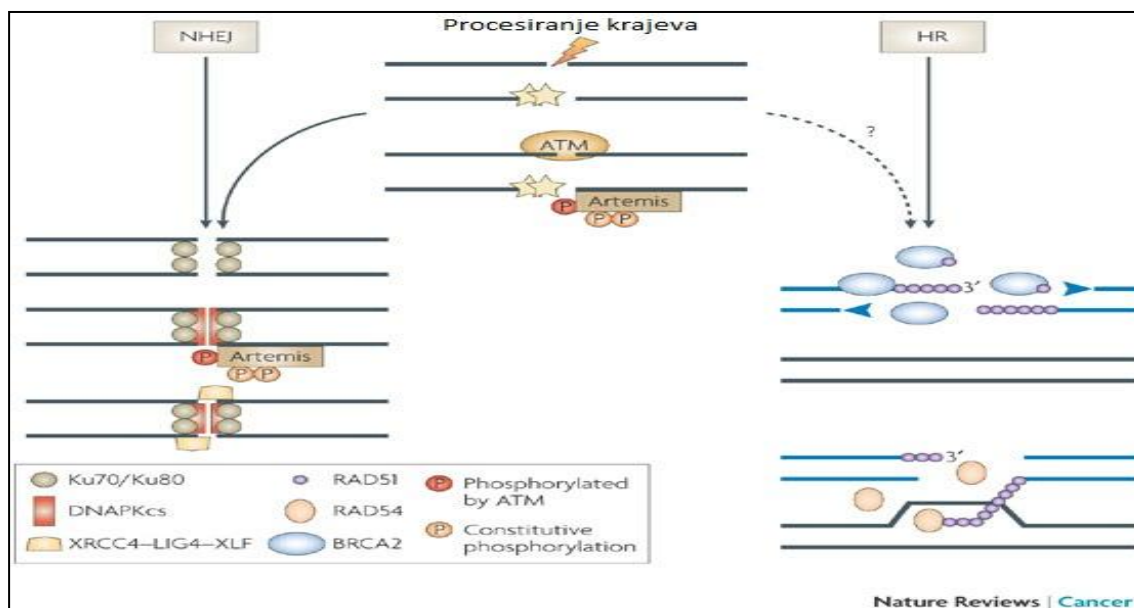
Dvolančani lom DNA predstavlja jednu od najsnažnijih prijetnja genomskom integritetu zbog toga što predstavlja značajan problem za transkripciju, replikaciju i segregaciju kromosoma u mitozu. Razlikuje se od ostalih oštećenja DNA po tome što ne postoji komplementaran lanac koji bi služio kao kalup za sintezu. Može nastati proklizavanjem replikacijske vilice tijekom replikacije DNA ili djelovanjem jednog od najsnažnijih agenasa – ionizirajućeg zračenja. Također, mogu nastati i ukoliko se nepopravljeni jednolančani lom DNA replicira.

Aktivacija signala za popravak dvolančanog loma DNA uključuju PI(3)K kinaze, ATM i ATR. Dvolančani lom iducira aktivaciju ATM, dok jednolančani aktivira ATR. Aktivirane, ATM i ATR fosforiliraju ciljane proteine i histon H2AX, rezultirajući lokalnom alteracijom kromatinske strukture. Fosforilirani kompleks ATM/CHK2, kao i ATR/CHK1 mogu fosforilirati i aktivirati supresorski protein p53.

Popravak dvolančanog loma vrši se dvjema metodama; homolognom rekombinacijom (HR) i nehomolognim sparivanjem krajeva (NHEJ).

3.2.2. Homologna rekombinacija

Homolognom rekombinacijom (HR) popravak dvolančanog oštećenja vrši se korištenjem neoštećenog homolognog kromosoma u slučaju popravka tijekom mejoze, ili sestrinske kromatide tijekom mitoze. Većina popravka HR odvija se u kasnoj S i G2 fazi staničnog ciklusa kada je neoštećene sestrinske kromatide moguće iskoristiti kao kalup. Procesom upravlja nekoliko proteina RAD obitelji: RAD50, RAD51, RAD52, RAD54. RAD52 je senzor za prepoznavanje lomova DNA. Procesiranjem oštećenog lanca produljuje se jednolančani 3' kraj lanca na koji se veže RAD51 i tvori nukleoproteinski filament koji potom traži komplementaran slijed na neoštećenoj homolognoj kromatidi. Oštećena i neoštećena DNA tada homologno rekombiniraju: DNA polimeraza stvara 3' kraj na invadirajućem lancu, a ligaza ligira strukturu heterodupleksa (Hollidayeva veza). Produkt je popravljeni lanac DNA (**Slika 6**).



Slika 6; Shematski prikaz popravka DNA homolognom rekombinacijom (desno) i nehomolognim pridruživanjem krajeva (lijevo).

Izvor: http://www.nature.com/nrc/journal/v7/n11/fig_tab/nrc2248_F2.html

3.2.3. NHEJ

Za razliku od HR, nehomolognim popravkom oštećenja DNA, kao što i sam naziv govori, nije potreban homologni kalup, što često uzrokuje grešku prilikom samog popravka. Protein esencijalan za NHEJ jest heterodimer Ku70/Ku80 koji inicira NHEJ vežući slobodne krajeve DNA i aktivirajući odgovarajuće protein - kinaze (DNA-PK) i ligaze. Fosforilacijom određenih faktora olakšava se proces popravka. Ponekad se zbog prevelikog oštećenja krajeva DNA krajevi ne mogu direktno ligirati, već su potrebni dodatni mehanizmi koji uključuju MRE11/Rad50/NBS1complx. I Artemis protein. Konačan proces NHEJ jest ligacija krajeva DNA ligazom IV (**Slika 6**).

3.3. Mehanizmi obrane od destabilizacije genoma

Evolucijski, organizmi su stekli brojna svojstva koje su im omogućavala bolju prilagođenost na uvjete života, način hranjenja, klimu, predatore. Sličan proces odvijao se i na staničnoj razini, tzv. mikroevolucija. Stanice su postajale sve otpornije na vanjska oštećenja, razvile su mehanizme popravka nasljedne upute, kao i preciznu kontrolu staničnog ciklusa.

Primjerice, tkiva koja funkcionalno služe zaštititi cjelokupnog organizma od vanjskih uvjeta, kao što je epitelno tkivo, neprekidno se obnavlja upravo iz razloga da se uklone stare stanice u kojima postoji vjerojatnost genskih mutacija zbog izloženosti nepovoljnim, mutagenim uvjetima. Postoje i brojne fiziološke prilagodbe, kao što je, primjerice, kod melanina u stanicama kože, apsorbirajući mutageno ultraljubičasto zračenje. Razni enzimi smanjuju koncentraciju kisikovih radikala koji nastaju tijekom normalnog staničnog metabolizma. Enzimi citokroma P-450 detoksiciraju kemijski toksične tvari, a glutation-S-transferaze konjugiraju glutation s elektrofilnim komponentama koje bi mogle oštetiti DNA.^[1]

Unatoč brojnim razinama zaštite od destabilizacije genoma, stanice starenjem mogu razviti preinake kojima izbjegavaju detekciju nestabilnosti, npr. inaktivacija kontrolnih proteina staničnog ciklusa. Deregulacija ciklusa i nepopravljeno oštećenje genoma uzrokuje progresivnu akumulaciju lezija koje mogu prijeći u onkogene, stoga kod ljudi postoji veliki rizik za razvoj tumorskih bolesti u dobi od 40 do 80 godina. Također, mutacije mogu obuhvatiti i proteine popravljачe DNA, kao i one koji služe kao zaštita od nastanka kromosomskih abnormalnosti. Nakupljene mutacije i kromosomska nestabilnost destabiliziraju genom i omogućavaju progresiju onkogene transformacije.

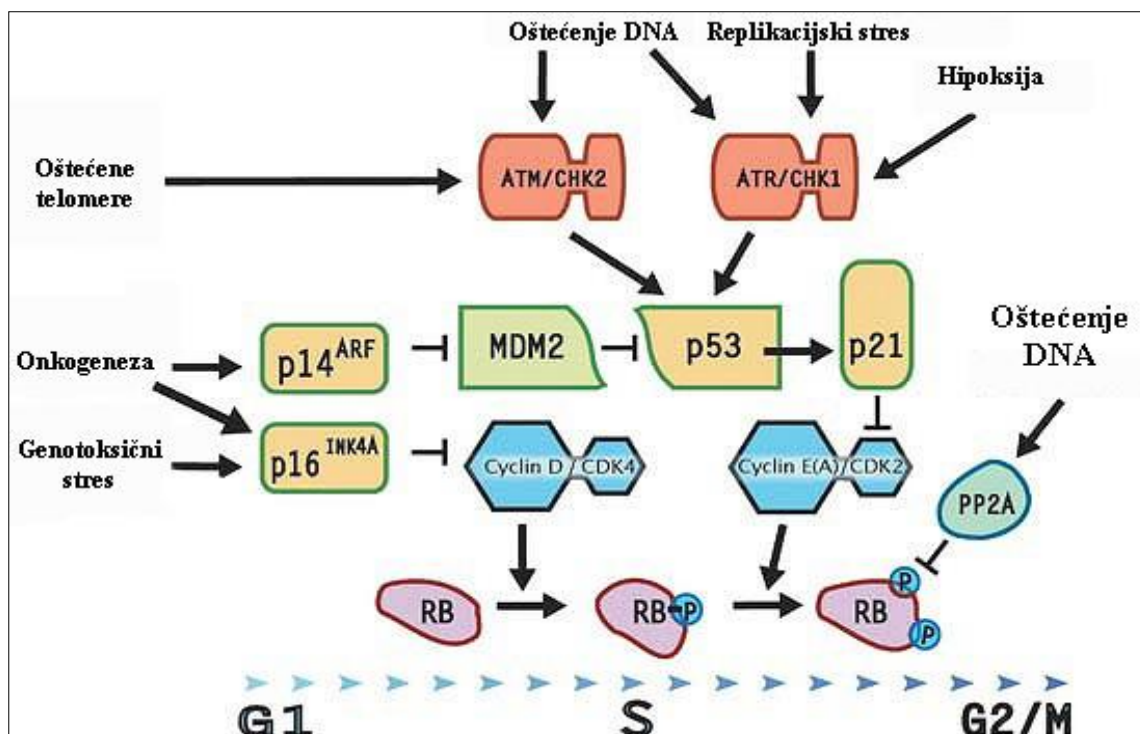
3.3.1. Kontrola staničnog ciklusa

Pravovremeno odvijanje staničnih dioba temelj je normalnog rasta, razvitka, ali i održavanja svake jedinke, stoga diobe moraju biti koordinirane staničnim rastom i replikacijom DNA. Sposobnost stanice, optimalni uvjeti i samo napredovanje kontrolira se pri svakom prijelazu u iduću fazu ciklusa. Mjesta regulacije nazivaju se kontrolne točke (**Slika 3**), a tijekom diobe stanice moraju proći kroz sve tri (iz G1 u S, G2 u M i kod segregacije kromosoma).

Glavni početni kontrolni signalni sustav uključuje put retinoblastma proteina (RB), te je stoga najčešća meta mutacija. Povezuje faktore rasta unutar i izvan stanice. Ima ulogu represora, dakle, u kompleksu s E2F transkripcijskim faktorima mijenja ekspresiju ciljanih gena uključenih u diobu stanice tako da sjeda na promotorsko mjesto. Ciljani geni uključuju komponente potrebne za sintezu nukleotida i replikaciju DNA koje su ključne u prijelazu iz G1 u S fazu ciklusa. RB protein se fosforilira ako su prisutni pozitivni signali iz G1 faze za nastavak ciklusa, čime inaktivira ciklin-ovisnu kinazu (CDK). Ciklin E/CDK2 i ciklin A/CDK2 kompleksi pokreću ekspresiju E2F gena i omogućuju stanici ulazak u S fazu. Ciklin E/CDK2 regulira aktivaciju transkripcije histona i inicijaciju replikacije kromosoma i centrosoma.

Drugi, vrlo važan tumor supresorski protein je p53. Koordinira mehanizmima kod disfunkcije telomera, stanju šoka, nedostatku kisika i utišava aktivirane onkogene. Tumorske stanice ne sadrže p53 protein te stoga sadrže brojne nestabilnosti unutar genoma, jer stanični ciklus ne prolazi mehanizme provjere integriteta genoma. Aktivacijom na kontrolnoj točki fosforilira se i višestruko se povisuje njegova koncentracija u citoplazmi, te se translocira u jezgru. Tada aktivira zaustavljanje staničnog ciklusa, senescenciju ili apoptozu, ovisno o prisutnim uvjetima.

Kontrola zapravo predstavlja DNA senzore; ATM (ataxia-telangiectasia mutated), AT i ATR (Rad3-related) kinaze. ATM se aktivira kod dvolančanih lomova, a ATR kod DNA lezija i nepravilnosti replikacijskih rašlji. Kod prepoznavanja nepravilnosti, fosforiliraju proteine CHK2 i CHK1 preko supstrata p53 proteina.



Slika 3; Prikaz kontrolnih točaka između pojedinih faza u staničnom ciklusu ovisno o tipu oštećenja

Izvor: Devita, Hellman & Rosenberg's Cancer - Principles & Practice of Oncology, 8th Edition.

Progresivnu akumulaciju oštećenih stanica sprječava senescencija. Najčešće se javlja u staničnoj kulturi iscrpljivanjem replikacijskog potencijala, ali *in vivo* nastaje aktivacijom onkogeni, oksidativnim stresom, ali i progresivnim smanjenjem duljine telomera koje stanica prepoznaje kao oštećenje DNA i tretira kao genotoksični stres. Inaktivacijom p53 i RB proteina, skraćivanje telomera dovodi do povećanja genetske nestabilnosti i kriznog stadija. Većina stanica umire, no one koje prežive, maligne su jer su nakupile previše genetičkih promjena.

8. ZAKLJUČAK

Stanica održava svoj genski identitet, a time i homeostazu molekulskim mehanizmima popravka DNA, intra i interstaničnom komunikacijom, kao i heterozigotnošću. Osobito značajan popravak DNA jest popravak dvolančanih lomova homolognom rekombinacijom, gdje se kao neoštećen kalup uzima homologni kromosom, i nehomologo povezivanje krajeva kromosoma, čime se često induciraju greške koje dovode do prekarcinogenetskih stanja. Djelovanjem raznih agenasa, patogena ili oksidativnog stresa u stanici može doći do raznih poremećaja proteina koji sudjeluju u kontrolim djelatnostima staničnog ciklusa, čime dovode do destabilizacije genoma. Također, nestabilnost može biti uzrokovana produljenjem telomernih krajeva kromosoma koji služe kao zaštita genomskog integriteta, čime se povećava vjerojatnost prespajanja kromosoma, a time i akumulacija prekarcinogenetskih promjena (poput delecije, aneuploidije, duplikacije). Tumorske stanice novostečenim mehanizmima vješto izbjegavaju kontrolne točke staničnog ciklusa, apoptozu ili senescenciju, supresore rasta; počinju migrirati u druga tkiva čime induciraju proces angiogeneze te podliježu besmrtnosti.

9. LITERATURA

- [1] D. Hanahan & R.A. Weinberg - Hallmarks of Cancer: The Next Generation
- [2] Weinberg RA. The biology of Cancer. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC. 2007;353.
- [3] L. E. Donate & M. A. Blasco (2011). Telomeres in cancer and ageing. Phil. Trans. R. Soc. B 12 January 2011 vol. 366 no. 1561 76-84
- [4] M. Collado & M. Serrano (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. Nat. Rev. Cancer, 10 (2010), pp. 51–57
- [5] Devita, Hellman & Rosenberg's Cancer - Principles & Practice of Oncology, 8th Edition.
- [6] Hoare, S. F., Bryce, L. A., Wisman, G. B., Burns, S., Going, J. J., van der Zee, A. G., & Keith, W. N. (2001). Lack of telomerase RNA gene hTERC expression in alternative lengthening of telomeres cells is associated with methylation of the hTERC promoter. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Cancer Res*, 61(1), 27-32.
- [7] Bodnar, A. G., Kim, N. W., Effros, R. B., & Chiu, C. P. (1996). Mechanism of telomerase induction during T cell activation.
- [8] Wu, X. M., Tang, W. R., & Luo, Y. (2009). [ALT--alternative lengthening of telomere]. [Research Support, Non-U.S. Gov'tReview]. *Yi Chuan*, 31(12), 1185-1191.
- [9] <http://learn.genetics.utah.edu/content/begin/traits/telomeres/>
- [10] http://www.rndsystems.com/MiniReview_MR03_DNADamageResponse.aspx

10. SAŽETAK

Tumori su nastali kao produkt djelovanja evolucije, odnosno prirodne selekcije na razini stanice, tzv. mikroevolucijom. U evolucijskoj povijesti prisutni su koliko i višestaničnost jer je ponekad, zbog raznih okolišnih uvjeta, nemoguće održavati i kontrolirati integritet kompleksnog sustava. Temelj homeostaze jest međustanična komunikacija. Ukoliko se nepravilnost unutar stanice prepozna pravovremeno, kontrolne točke obustavljaju daljnju diobu i odvođe stanicu u apoptozu (programiranu staničnu smrt) ili senescenciju (prestanak dioba). Ukoliko stanice izbjegnu taj proces, postaju tumorske, s beskonačnim replikacijskim potencijalom. Kao i svaka stanica zahtijevaju opskrbu kisikom i hranjivim tvarima, kao i odvođenje otpadnih produkata metabolizma i faktora rasta, te uspostavljaju mrežu novih krvnih žila u svojoj okolini procesom angiogeneze. U takvim povoljnim uvjetima nastavljaju proliferirati i zauzimaju sve širi prostor svoje okoline, te započinju penetrirati dublje u tkivo ili čak migrirati putem krvnih žila na neko sasvim novo mjesto u organizmu.

Oštećenja koja prepoznaju kontrolni putovi najčešće su oštećenja najvažnije stanične komponente, nasljedne upute. Stoga se na krajevima kromosoma nalaze zaštitni nukleoproteinski kompleksi koji održavaju stabilnost, a ujedno i čuvaju nasljednu uputu od delecije koja bi bila neizbježna tijekom svake diobe. Ipak, sustav telomera se, zbog svojstava DNA polimeraze i eukariotske replikacije općenito, svakom diobom skraćuje. Njihov gubitak može nanovo sintetizirati enzim telomeraza, koji je pak prisutan samo u tumorskim i embrionalnim stanicama. Alternativnim produljenjem telomera induciraju se prekarinogenetske promjene jer se aktivira mehanizam fuzije, loma i ponovnog prespajanja kromosoma, što se manifestira kao genetska promjena.

Proučavanje telomera, kao i tumora, aktualno je područje znanstvenog istraživanja, osobito zbog sve većeg udjela tumorskih bolesti u populaciji. U većini zamršenih mehanizama postoje tek naznake njihovog funkcioniranja, što otežava brzinu pronalaska potencijalnih, prijeko potrebnih lijekova. Izazov današnjeg doba jest istražiti ključne promjene u specifičnim funkcijama tumorskih stanica nastale kao rezultat evolucije svakog tumora zasebno, otkriti zajednička načela te primijeniti te spoznaje u dijagnostici i liječenju bolesti.

11. SUMMARY

Organisms have evolved complex adaptations for survival under the natural laws. On the same way, tumors are product of microevolution among individual cells. In the evolutionary history, they were present at the same time when single-cells started to form multicellular organism from integrated complex tissues in order to preserve the homeostasis. Modified cells are recognized by diverse control mechanisms, which then induce apoptosis (programmed cell death) or senescence, absence of mitosis and DNA replication. If modified cells escape these mechanisms, they can form a part of a huge deregulated cell mass called tumor. Just like every other cell, they also require an oxygen, nutrition and revulsive system for toxic metabolic products and growth factors. They establish a blood vessels all round them by the process called angiogenesis. In favorable environment they start to penetrate deeper in the tissue, or even to migrate to some new tissues by blood, forming metastases.

Chromosomes are protected with telomeres, a nucleoprotein specific repetitive complex at their edges. Because of the specific properties of eukaryotic transcription and the enzyme DNA polymerase, telomeres are shortening with every mitotic cycle. There is an enzyme called telomerase, with the ability to elongate shortened telomeres, but it is only present in embryonic and tumor cells. Alternative lengthening of telomeres carries the risk of genetic change called breakage-fusion-bridge cycle.

Telomeres and tumors are in the focus of scientific research, especially because of the increasing incidence in our population. Finding a cure for tumors is a competitive field for scientists, but it is difficult to achieve it without their mutual communication and collaboration.